

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



5

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/37, A61K 39/12</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 98/04705</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 5 février 1998 (05.02.98)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/01412 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 29 juillet 1997 (29.07.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/09584 30 juillet 1996 (30.07.96) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BALLOUL, Jean-Marc [FR/FR]; 12, rue des Alouettes, F-67380 Lingolsheim (FR). BIZOUARNE, Nadine [FR/FR]; 5, rue de Mutzig, F-67300 Schiltigheim (FR). KIENY, Marie-Paule [FR/FR]; 6, allée des Platanes, F-67100 Strasbourg (FR). <b>(74) Mandataires:</b> MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING PAPILLOMAVIRUS TUMOURS AND INFECTION <b>(54) Titre:</b> COMPOSITION PHARMACEUTIQUE CONTRE LES TUMEURS ET INFECTIONS A PAPILLOMAVIRUS  <b>(57) Abstract</b> <p>A pharmaceutical composition for treating or preventing a papillomavirus infection or tumour, including, as the therapeutical agents, a polypeptide from an early region and a polypeptide from a late region of a papillomavirus, optionally combined with a polypeptide having immunostimulatory activity or a polypeptide from an early or late region of a papillomavirus and a polypeptide having immunostimulatory activity, or alternatively, a recombinant vector containing inserted DNA fragments coding for the above-mentioned polypeptide combinations.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus qui comprend à titre d'agents thérapeutiques un polypeptide originaire d'une région précoce et un polypeptide originaire d'une région tardive d'un papillomavirus éventuellement associés à un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice ou un polypeptide originaire d'une région précoce ou tardive d'un papillomavirus et un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice ou, de manière alternative, un vecteur recombinant dans lequel sont insérés les fragments d'ADN codant pour les combinaisons de polypeptides citées ci-dessus.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Composition pharmaceutique  
contre les tumeurs et infections à papillomavirus**

5

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique destinée au traitement ou la prévention des lésions associées aux papillomavirus et plus particulièrement aux papillomavirus humains (HPV) de type 16, 18, 31, 33 et 45.

10 Les papillomavirus sont des virus à ADN possédant un génome circulaire d'environ 7900 paires de bases entouré par une capsidie protéique. Un certain nombre de types de papillomavirus bovins (BPV), humains (HPV) ont été identifiés et leur génome séquencé (Pfister, 1987, in *The papovaviridae : The Papillomaviruses* (édition Salzman et Howley) Plenum Press, New York, p 1-38).

15 Il comprend une région précoce et une région tardive. La région tardive contient deux cadres de lecture L1 et L2 qui codent pour les composants majeurs de la capsidie. La région précoce contient au moins les cadres de lecture E1, E2, E4, E5, E6 et E7. Les produits d'expression E1 et E2 régulent la réplication virale et l'expression des gènes viraux alors que ceux des régions E5, E6 et E7 sont

20 impliqués dans les processus de transformation oncogénique des cellules infectées. En effet, il a été montré expérimentalement que la protéine E5 de BPV-1 peut *in vitro* transformer des cellules (Schlegel et al., 1986, Science 233, 464-467). Les protéines E6 de BPV-1 et E7 de HPV-16 sont impliquées dans l'induction et le maintien de la transformation oncogène. Le pouvoir transformant de E7 a été

25 démontré pour HPV-16 et HPV-18 (Kanda et al., 1988, J. Virol. 62, 610-613 ; Vousden et al., 1988, Oncogene Res. 3, 1-9 ; Bedell et al., 1987, J. Virol. 61, 3635-3640). Il n'a pas été mis en évidence de fonction à E4.

Chez l'homme, les HPV sont associés à des pathologies allant de l'infection bénigne de la peau aux verrues et aux tumeurs malignes. Ces virus sont hautement

30 spécifiques des épithélium de l'épiderme des voies génitales, orales et respiratoires. Les données épidémiologiques suggèrent fortement le rôle de certaines souches

- 2 -

dans le cancer du col de l'utérus et des voies basses, en particulier les HPV-16 et 18 et à un moindre degré les HPV-31, 33 et 45. Le cancer du col utérin est la deuxième cause de cancer féminin dans le monde. Selon l'OMS, 460000 nouveaux cas sont répertoriés chaque année dont 200000 cas au moins sont clairement associés aux HPV. Toute une série d'études démontre le rôle transformant de ces virus, leur intégration spécifique dans le génome des cellules néoplasiques, leur activité génique dans les cellules cancéreuses et l'importance de l'expression des gènes précoces E6 et E7 dans le maintien du phénotype malin des cellules néoplasiques HPV positives (Monsenego, J. Impact Medecin, 11 mars 1994).

Les pathologies associées aux virus HPV posent un problème thérapeutique du fait de leur nature persistante et récurrente. De nombreuses approches ont déjà été utilisées dans le traitement de ces maladies comme la chirurgie, la chimiothérapie, les agents antiviraux et l'immunothérapie.

A cet égard, le brevet européen EP 0 462 187 décrit une approche de vaccination utilisant les gènes précoces des papillomavirus pour établir une immunité à l'égard des tumeurs résultant de l'intégration du génome HPV dans l'ADN cellulaire et dans lesquelles les protéines de la capsid ne sont plus exprimées. La demande WO 93/02184 enseigne une approche thérapeutique basée sur l'utilisation des antigènes de capsid à titre d'agents immunogènes. Ces documents ne suggèrent pas la possibilité d'associer l'effet préventif procuré par les polypeptides précoces et l'effet curatif conféré par les polypeptides tardifs des papillomavirus pour générer des compositions adaptées à l'ensemble des pathologies graves dues aux HPV. Par ailleurs, au cours des dernières années, il a été proposé d'utiliser des polypeptides ayant une activité immunostimulatrice dans le but d'activer les cellules T avec un résultat plus ou moins bénéfique selon les pathologies ciblées (voir par exemple WO 96 / 11279).

La présente invention concerne plus précisément une préparation basée sur un mélange d'antigènes originaires des régions précoces et tardives d'un papillomavirus ou un vecteur les exprimant simultanément, dans le but d'établir une immunité durable à l'encontre des cellules infectées. Les candidats vaccins proposés dans le cadre de la présente invention peuvent être utilisés à titre préventif

- 3 -

(immunoprophylaxie) pour limiter le développement ou la propagation de l'infection virale aux tissus voisins ou à titre curatif (immunothérapie) pour empêcher ou réduire une évolution tumorale chez les patientes infectées. L'utilisation des antigènes de capsid va induire la production d'anticorps contre  
5 les épitopes antigéniques localisés à la surface des particules virales empêchant l'infection de s'établir durablement. L'usage des protéines précoces va permettre d'induire une immunité à l'encontre des cellules infectées après intégration de l'ADN viral.

La présente invention fournit également une préparation associant un  
10 polypeptide originaire d'un papillomavirus et une molécule immunostimulatrice. Un des avantages d'une telle composition est qu'elle combine l'immunité spécifique induite par les antigènes viraux et l'immunité aspécifique induite par la molécule immunostimulatrice et destinée à renforcer la réponse spécifique.

Le but de la présente invention est de mettre à la disposition du public des  
15 compositions pharmaceutiques permettant le traitement des infections à HPV et plus particulièrement les pathologies graves telles que le cancer du col de l'utérus, d'une efficacité améliorée par rapport aux compositions de l'art antérieur.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'une infection ou tumeur  
20 à papillomavirus qui comprend à titre d'agents thérapeutiques :

- (1) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus et au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus,
- (2) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un  
25 papillomavirus, au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice, ou
- (3) au moins un polypeptide originaire d'une région précoce ou tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité  
30 immunostimulatrice.

D'une manière générale, le terme polypeptide fait référence à tout ou partie

- 4 -

du polypeptide natif, à un polypeptide chimère résultant de la fusion de séquences d'origines différentes ou à un variant caractérisé par au moins une mutation (délétion, insertion et/ou substitution) d'un acide aminé. De manière plus particulière, un polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention a  
5 notamment une séquence en acides aminés dont le degré de similarité avec la séquence de la protéine native est supérieur à 75 %, avantageusement, supérieur à 85 % et, de préférence, supérieur à 95 %. Le degré de similarité peut être aisément calculé à l'aide d'un programme ordinateur approprié ou en alignant les séquences de manière à obtenir le degré maximal d'homologie et en comptabilisant  
10 le nombre de positions dans lesquelles les acides aminés des deux séquences se retrouvent à l'identique par rapport au nombre total de positions. La séquence des génomes de HPV-16 et de HPV-18 est divulguée dans Genbank aux numéros d'accès K02718 et X05015 respectivement.

Comme rappelé précédemment, le génome des virus de la famille des  
15 papillomavirus, en particulier BPV et HPV, code pour au moins 8 polypeptides, deux polypeptides tardifs L1 et L2 composant la capside virale et 6 polypeptides précoces (E1, E2, E4, E5, E6 et E7) impliqués dans la régulation, le maintien du génome viral et la transformation des cellules infectées.

Bien que l'ensemble des protéines précoces d'un papillomavirus puisse être  
20 utilisé dans le cadre de la présente invention, on choisit avantageusement de mettre en oeuvre un polypeptide dérivé de la protéine E6, de la protéine E7 ou des protéines E6 et E7. Il peut être avantageux d'avoir recours à un variant non oncogène muté au niveau des régions impliquées dans le processus de transformation des cellules infectées. De tels variants sont décrits dans la littérature  
25 (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105 ; Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556 ; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446 ; Phelps et al., 1992, J. Virol. 66, 2418-2427).

Un polypeptide préféré originaire de la région tardive d'un papillomavirus dérive de la protéine L1, de la protéine L2 ou des protéines L1 et L2.

30 Selon les modes de réalisation (2) et (3) particulièrement avantageux, une composition selon l'invention comprend également un polypeptide ayant une

- 5 -

activité immunostimulatrice. Par "immunostimulatrice", on entend la capacité à stimuler une réponse immunitaire humorale en activant les lymphocytes B afin d'amplifier la production d'anticorps dirigés contre les antigènes de papillomavirus ou à stimuler une réponse immunitaire à médiation cellulaire en activant les lymphocytes T afin de déclencher une réponse cytotoxique significative à l'encontre de cellules tumorales ou infectées par un papillomavirus. A titre indicatif, l'immunostimulation peut être évaluée en modèle animal (par comparaison du taux de rejet dans un animal auquel on a greffé une tumeur exprimant l'antigène cible, ceci en présence et en absence de l'immunostimulateur). D'une manière plus générale, les moyens pour mettre en évidence une immunostimulation sont indiqués dans Roitt (in *Immunology*, 4th edition, Moby Ltd).

On peut utiliser une molécule immunostimulatrice native telle que trouvée dans un mammifère et, en particulier chez l'homme, une partie de celle-ci, une molécule chimérique provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou un mutant, à la condition toutefois de conserver la fonction immunostimulatrice. Parmi toutes les molécules envisageables, on préférera mettre en oeuvre un polypeptide constitué par ou dérivé de l'interleukine-2, de l'interleukine-7, de l'interleukine-12 et des molécules de co-adhésion B7.1 et B7.2, l'interleukine-2 et la molécule B7.1 étant particulièrement préférées dans le cadre de la présente invention.

Une composition préférée selon l'invention comprend :

- (1) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1 et un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus,
- (2) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,
- (3) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de la molécule B7.1,
- (4) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la

région E7 d'un papillomavirus, un polypeptide dérivé de la molécule B7.1 et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,

- (5) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,
- (6) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de la molécule B7.1, ou
- (7) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus, un polypeptide dérivé de la molécule B7.1 et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2.
- Etant donné les observations rappelées plus haut sur la fréquence d'infection par certains types d'HPV dans les cas de cancer du col de l'utérus, une composition selon l'invention comprend un polypeptide originaire d'un papillomavirus à risque, de type HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 et/ou HPV-45 et en particulier du virus HPV-16. Bien entendu, dans le cas où la composition inclut plusieurs antigènes de papillomavirus, ceux-ci peuvent être d'une origine commune ou différente.

D'une manière générale, un polypeptide originaire d'un papillomavirus ou ayant une activité immunostimulatrice peut être produit par les méthodes conventionnelles de synthèse chimique ou bien par les techniques de l'ADN recombinant (voir par exemple Maniatis et al., 1989, *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Plus particulièrement, un procédé de préparation comprend l'acte de cultiver une cellule transformée par un fragment d'ADN codant pour le polypeptide en question pour générer une cellule productrice et l'acte de récolter ledit polypeptide à partir de la culture. La cellule productrice peut être d'une origine quelconque et sans limitation, une bactérie, une levure ou bien une cellule de mammifère, dans la mesure où le



- 7 -

fragment d'ADN considéré est soit intégré dans son génome soit intégré dans un vecteur d'expression approprié capable de se répliquer. Bien entendu, le fragment d'ADN est placé sous le contrôle de signaux de transcription et de traduction permettant son expression dans la cellule productrice. Vecteurs d'expression et  
5 signaux de contrôle sont connus de l'homme du métier.

La présente invention vise également une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus qui comprend à titre d'agent(s) thérapeutique(s) un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dans le(s)quel(s) sont insérés des fragments d'ADN  
10 codant pour :

- (1) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus et au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus,
- (2) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus, au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un  
15 papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice, ou
- (3) au moins un polypeptide originaire d'une région précoce ou tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité  
20 immunostimulatrice ;

lesdits fragments d'ADN étant placés sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte.

Selon cette alternative par ailleurs préférée, l'agent thérapeutique est un vecteur dans lequel sont insérés les fragments d'ADN codant pour les polypeptides  
25 originaires d'un papillomavirus ou immunostimulateurs tels que définis précédemment. Ce type de composition présente l'avantage d'une production bon marché et d'une grande stabilité dans des conditions d'environnement variées. En particulier, les conditions de conservation sont moins contraignantes.

Les fragments d'ADN codant pour un polypeptide originaire d'un  
30 papillomavirus peuvent être obtenus par clonage, par PCR (Polymerase Chain Réaction) ou par synthèse chimique selon les techniques conventionnelles

- 8 -

communément en usage à partir de cellules papillomavirus positives obtenues de patients ou de collections.

Le gène codant pour un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice peut également être isolé selon les techniques standards à  
5 partir du génome d'une cellule (type génomique) ou des ARN messagers d'une cellule dans laquelle il est exprimé (type ADN complémentaire). Par ailleurs, le gène en question peut coder pour (i) une molécule soluble, soit intracellulaire soit sécrétée dans le milieu extérieur ou (ii) une molécule ancrée dans la membrane et donc présente à la surface des cellules qui l'expriment.

10 Un vecteur recombinant préféré dans le cadre de l'invention est un vecteur viral dans le génome duquel ont été insérés les fragments d'ADN précités de manière à permettre leur transfert et leur expression dans une cellule ou un organisme hôte. Un vecteur viral pouvant être mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention, peut être dérivé notamment d'un poxvirus, d'un  
15 adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus de l'herpès ou d'un virus associé à l'adénovirus. Avantagusement, il s'agira d'un vecteur non-intégratif et d'une virulence atténuée. De tels vecteurs ainsi que leurs techniques de préparation sont connus de l'homme de l'art.

Dans le cas où l'on met en oeuvre un vecteur adénoviral, on aura de  
20 préférence recours à un vecteur non répliatif par délétion de régions essentielles à la répliation et, notamment, de la majorité de la région E1 afin d'éviter sa propagation au sein de l'organisme hôte ou l'environnement. Il va de soi que l'on peut modifier ou déléter d'autres régions du génome adénoviral, dans la mesure où les fonctions essentielles défectives sont complétées en  
25 *trans*. Un vecteur adénoviral préféré selon l'invention retiendra les séquences essentielles à l'encapsidation, à savoir les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsidation. Les différents vecteurs adénoviraux ainsi que leurs techniques de préparation sont conventionnels et sont décrits dans Graham et Preveet (1991, in *Methods in Molecular Biology*, vol 7, p 109-128 ; Ed : E.J.  
30 Murey, The Human Press Inc.) et la demande internationale WO 94/28152. S'il

- 9 -

s'agit d'un rétrovirus, on conserve les LTRs (Long Terminal Repeat) et les séquences d'encapsulation (voir par exemple Naviaux et Verma, 1992, *Current Opinion in Biotechnology* 3, 540-547).

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur viral recombinant  
5 selon l'invention dérive d'un poxvirus et, notamment, d'un poxvirus aviaire, tel que le poxvirus du canari, d'un fowlpox ou d'un virus de la vaccine, ce dernier étant préféré. Parmi tous les virus de la vaccine envisageables dans le cadre de la présente invention, on choisit de préférence les souches Copenhague, Wyeth et Ankara modifiée (MVA pour Modified Vaccinia Virus Ankara). Les conditions  
10 générales d'obtention d'un virus de la vaccine capable d'exprimer un gène hétérologue sont enseignées dans le brevet européen EP 83 286 et la demande EP 206 920. Quant au virus MVA, il est plus particulièrement décrit dans (Mayr et al., 1975, *Infection* 3, 6-14 ; Sutter et Moss, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10847-10851).

15 Bien entendu, dans le cadre de la présente invention, les fragments d'ADN sont placés sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression. Ceux-ci incluent les éléments appropriés de régulation de la transcription ainsi que des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction. Le promoteur revêt une importance particulière. D'une façon générale, on aura recours à un  
20 promoteur fonctionnel dans l'organisme ou la cellule hôte que l'on veut traiter et adapté au vecteur employé. En outre, il peut être modifié de manière à contenir des séquences régulatrices, par exemple un élément activateur de la transcription ou des séquences répondant à certains signaux cellulaires. A cet égard, il peut être avantageux d'utiliser un promoteur tissu-spécifique puisque  
25 les lésions associées aux papillomavirus sont localisées au niveau des voies génitales ou un promoteur répondant à des signaux spécifiquement tumoraux (par exemple activé en présence de facteurs de croissance généralement surexprimés par les cellules tumorales) afin de limiter l'expression aux seules cellules tumorales.

30 Parmi les promoteurs envisageables dans le cadre de l'invention, on peut

citer les promoteurs SV40 (Virus Simian 40), HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl-coenzyme A), TK (Thymidine Kinase), CMV (cytomégalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), le MLP (Major Late Promoter) de l'adénovirus adaptés au vecteur adénoviraux et le LTR du Mo-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) plus spécifiques aux vecteurs rétroviraux. Lorsque le vecteur dérive d'un poxvirus, de préférence le promoteur sera le promoteur d'un gène du poxvirus utilisé, par exemple le promoteur du gène codant pour la protéine 7,5K, H5R, TK ou K1L du virus de la vaccine. Ces derniers sont décrits dans la littérature et peuvent être clonés à partir du génome viral par les techniques classiques.

Par ailleurs, les éléments nécessaires à l'expression peuvent également comporter des séquences améliorant l'expression ou le maintien dans la cellule hôte (intron, séquence signal, séquence terminatrice de la transcription, site d'initiation de la traduction, séquences modifiant la présentation du polypeptide aux cellules du système immunitaires de l'hôte....). Cependant, s'agissant d'un vecteur dérivé d'un poxvirus, on évitera l'emploi d'introns.

Une composition selon l'invention peut être obtenue soit avec plusieurs vecteurs recombinants exprimant chacun un polypeptide donné soit avec un seul vecteur exprimant les fragments d'ADN correspondant aux polypeptides choisis placés sous le contrôle d'éléments indépendants ou communs. Selon cette dernière option, on peut avoir recours à des séquences permettant d'initier la traduction de manière interne (IRES) ou à des fusions en phase des différents gènes.

Les conditions générales d'obtention d'un vecteur recombinant en usage dans la présente invention sont largement décrits dans l'état de la technique. S'agissant d'un vecteur poxviral, on peut se référer au brevet européen EP 83 286 dont le contenu est ici incorporé par référence. Ces conditions sont applicables aux autres virus acceptables comme vecteur qui possèdent une région génomique non essentielle dans laquelle les blocs d'expression peuvent être incorporés. Bien entendu, ils peuvent être insérés dans le même locus ou un locus différent. Par exemple, lorsque l'on utilise un virus de la vaccine de la

- 11 -

souche Copenhague, le site d'insertion préféré est le locus TK et/ou le locus K1L. L'insertion au niveau du gène viral TK a pour effet d'inactiver celui-ci et ainsi faciliter la sélection des recombinants. Dans le cadre d'un virus de la vaccine de la souche MVA, l'insertion des gènes de papillomavirus et immunostimulateurs  
5 peut être réalisée au sein d'une des excisions I à VI et, de préférence, la zone d'excision II ou III (Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 ; Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032-1040).

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un vecteur recombinant peut en outre comprendre un bloc d'expression d'un gène  
10 marqueur de sélection afin de faciliter les étapes d'isolement et de purification du virus recombinant. On peut citer notamment le gène *Neo* conférant la résistance à l'antibiotique G418, le gène *pac* de résistance à la puromycine, le gène TK du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) qui confère la sensibilité à certains analogues de nucléosides tels que le ganciclovir ou  
15 l'acyclovir, les gènes bactériens *LacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase et *gus A* codant pour la  $\beta$ -glucuronidase. Ces deux derniers marqueurs enzymatiques permettent de repérer les virus recombinants par coloration en présence des substrats X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) et XglcA (5-bromo-6-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoronide) respectivement.

20 Une composition pharmaceutique selon l'invention en vue du traitement ou la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus, comprend un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dérivé(s) d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans le(s)quel(s) sont insérés :

- (1) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un  
25 fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7 1,
- (2) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2,
- 30 (3) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un

- 12 -

fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1 et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2,

- 5 (4) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus,
- 10 (5) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- 15 (6) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2, ou
- 20 (7) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1 et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2.

En revanche, une composition pharmaceutique selon l'invention plus  
25 particulièrement destinée à des fins d'immunoprophylaxie, comprend un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dérivé(s) d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans le(s)quel(s) sont insérés :

- 30 (1) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- (2) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un

- 13 -

- fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2, ou
- (3) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus, un
- 5 fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2 et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1.

Une composition selon l'invention peut être préparée selon les procédés connus dans le domaine des vaccins et les doses applicables peuvent varier dans une large gamme. Elles sont fonctions notamment des polypeptides et du virus

10 employés, de la pathologie à traiter, de l'état du patient et d'autres paramètres qui peuvent être évalués par le clinicien. Cependant, en général, la dose de virus par kilo sera de  $10^4$  à  $10^{11}$ , avantageusement de  $10^6$  à  $10^{10}$  et, de préférence de  $10^7$  à  $10^9$  unités formant des plages (ufp) lorsque l'agent thérapeutique est un vecteur viral et de 0,05 à 500 mg, avantageusement de 0,5 à 200 mg et, de préférence de

15 1 à 100 mg lorsque l'agent thérapeutique est d'origine polypeptidique.

Une composition selon l'invention peut être administrée selon n'importe quelle voie conventionnelle d'administration, en particulier par voie intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée ou sous-épithéliale ou bien par scarification. Dans le cas d'une tumeur accessible, il est également possible de recourir à une injection

20 directe dans le site ou à proximité de la tumeur ou à une application topicale. A titre de vaccin, une composition selon l'invention peut être administrée selon les pratiques courantes dans le domaine, par exemple en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Par contre dans le cadre d'un traitement curatif, elle peut être administrée fréquemment pendant une période

25 suffisante pour que le traitement soit efficace. Lorsque l'agent thérapeutique est un vecteur viral, ce virus est de préférence sous forme vivante. S'agissant d'un vecteur poxviral, on préférera employer une souche atténuée comme la souche MVA ou la souche Copenhagen thymidine kinase négative. Enfin un vecteur viral recombinant peut être atténué par un traitement chimique approprié connu de

30 l'homme du métier. Toutefois, on peut aussi envisager d'injecter un vecteur recombinant tué.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur recombinant en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Le support est choisi de manière à permettre son administration par injection à l'homme ou à l'animal. Elle peut également comprendre un véhicule, un diluant et/ou un adjuvant et se présenter sous forme liquide ou lyophilisée.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention, à titre de médicament pour le traitement ou la prévention du cancer du col de l'utérus, d'une dysplasie du col de bas grade et d'une infection à papillomavirus.

Enfin, la présente invention a également trait à une méthode de traitement ou de prévention des pathologies citées ci-dessus, selon laquelle on administre à un individu ayant besoin d'un tel traitement une quantité efficace d'un point de vue pharmaceutique d'un mélange de polypeptide ou d'un vecteur recombinant en usage dans la présente invention.

La présente invention est illustrée par référence aux Figures suivantes.

La Figure 1 est une représentation schématique du vecteur pTG5021 permettant le transfert au locus TK de la vaccine Copenhague des gènes tardifs L1 et L2 de HPV-16 placés sous le contrôle du promoteur p7,5K, les deux cassettes étant en orientation opposée l'une par rapport à l'autre.

La Figure 2 est une représentation schématique du vecteur pTG5065 permettant le transfert au locus K1L de la vaccine Copenhague des gènes précoces E6 et E7 de HPV-16 placés sous le contrôle du promoteur pH5R (les deux cassettes étant en orientation opposée l'une par rapport à l'autre), du gène IL-2 humain (IL2h) placé sous le contrôle du promoteur p7,5K et du gène marqueur LacZ (btaGAL) placé sous le contrôle du promoteur pK1L.

La Figure 3 illustre de manière schématique la stratégie qui peut être employée pour introduire les gènes tardifs L1 et L2 de HPV-16 au sein de la zone d'exclusion II d'un virus de la vaccine MVA, les bras de recombinaison gauche et droit étant indiqués (BRG2 et BRD2) respectivement.



## EXEMPLES

La présente invention est plus complètement décrite, sans pour autant être limitée, à l'aide des exemples suivants.

5 Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, *supra*) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. La mutagenèse dirigée *in vitro* par oligonucléotides synthétiques est effectuée à l'aide du kit distribué par Amersham. Les techniques d'amplification  
10 par PCR sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow).

15 Les étapes de clonage, les bactériophages M13 recombinants sont multipliés sur la souche *E. coli* NM522 (Stratagène) dans un milieu minimum gélosé (agar 7,5 %) ou dans un milieu riche LBM liquide. Les plasmides recombinants portant le gène de résistance à l'ampicilline sont repliqués dans les souches *E. coli* C600 (Stratagène), BJ 5183 (Hanahan, 1983, J Mol. Biol. 166,  
20 557-580) et NM522 sur milieu gélosé ou liquide supplémenté de 100 µg/ml d'antibiotique. On utilise préférentiellement la souche BJ5183 lorsque le clonage est effectué par recombinaison homologue (Bubeck et al., 1993, Nucleic Acid Res. 21, 3601-3602).

La construction des virus de la vaccine recombinants est effectuée selon la  
25 technologie classique dans le domaine divulguée dans les documents déjà cités et dans Mackett et al., (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) et Mackett et al. (1984, J. Virol. 49, 857-864).

EXEMPLE 1 : Construction du virus de la vaccine Copenhagen  
30 VVTG5021&5065 exprimant les gènes E6, E7, L1 et L2 du  
HPV-16 et le gène humain IL-2

A. *Isolement des gènes L1 et L2 de HPV16*

Les fragments codant pour les protéines L1 et L2 sont isolés par PCR à partir d'ADN génomique de cellules Caski (ATCC 1550) selon les techniques  
5 générales de l'art. Le fragment d'amplification portant les séquences L1 est sous cloné dans le vecteur M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99), pour donner la construction M13TG8171. La séquence du gène L1 cloné révèle plusieurs mutations par rapport à la séquence contenue dans Genebank (accession K02718) : C à la place d'un A en position 248, C à la place d'un A en position 253,  
10 G à la place d'un A en position 537, G à la place d'un C en position 682, G à la place d'un A en position 874, insertion d'un triplet ACT en position 1393, délétion d'un triplet GAT en position 1390. L'insertion du fragment PCR portant les séquences L2 dans le vecteur M13TG6131 conduit à M13TG9126. On dénombre 5 mutations ponctuelles par rapport à la séquence divulguée dans Genebank : C à  
15 la place d'un T en position 378, A à la place d'un G en position 691, A à la place d'un G en position 702, G à la place d'un A en position 990 et C à la place d'un A en position 1092. A titre indicatif, le vecteur M13TG6131 dérive de M13TG131 (Kieny et al., 1983, *supra*) par mutation du site *Bgl*II interne situé en dehors des sites multiples de clonage.

20

B. *Construction du vecteur pTG5021 pour le transfert des gènes L1 et L2 dans le locus TK du génome du virus de la vaccine*

Le gène codant pour la protéine L1 est modifié par création d'un site *Bgl*II  
25 en amont de l'ATG initiateur. Le gène muté est excisé du vecteur précédent (M13TG8185) par digestion *Bgl*II-*Sac*I et inséré entre les sites *Bam*HI et *Sac*I du pTG186-poly. La construction résultante est dénommée pTG4019. Le vecteur de transfert pTG186-poly est décrit en détail dans le brevet français 2 583 429. Il comporte 10 sites de restriction pour l'insertion du gène à transférer et le  
30 promoteur p7,5K pour le contrôle de son expression.

Le gène codant pour la protéine L2 est isolée de M13TG9126 par digestion

- 17 -

*Bgl*II-*Hind*III puis cloné entre les sites *Bam*HI et *Hind*III en 3' du promoteur 7,5K. On obtient M13TG9127 dans lequel on introduit par mutagenèse localisée un site *Sac*I en amont du promoteur. Le bloc d'expression "p7,5K-gène L2" est isolé du vecteur muté M13TG9129 et cloné dans le site *Sac*I du vecteur de transfert pTG4019 de telle manière que les deux cassettes p7,5K-L1 et p7,5K-L2 soient en orientation inverse. La construction ainsi obtenue pTG5021 est représentée à la Figure 1. Les blocs d'expression sont transférés dans le génome du virus de la vaccine souche Copenhagen par recombinaison homologue. Le virus recombinant désigné VVTG5021 est isolé par sélection au 5-bromodéoxyuridine (5BUDR)

C. *Isolement des gènes E6 et E7 de HPV16*

Les gènes E6 et E7 sont isolés à partir de la lignée cellulaire Caski comme décrit aux exemples 2 et 3 du brevet européen EP 0 462 187. Deux constructions ont été dérivées du clone M13E7/E6 contenant les gènes E6 et E7 du HPV-16 afin de faciliter les étapes ultérieures de clonage. La première désignée M13TG8188 résulte de l'introduction par mutagenèse dirigée de sites *Pst*I et *Bam*HI respectivement en amont et en aval du gène E7 et la seconde, M13TG8189 comporte un site *Pst*I en amont du gène E6. L'introduction de mutations ponctuelles en amont d'un ATG initiateur et en aval d'un codon stop sont à la portée de l'homme de l'art.

L'association de la protéine E7 de HPV-16 avec le produit du gène de rétinoblastome a été démontrée par divers auteurs (voir par exemple Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105) et corrélée à son pouvoir transformant. Pour des raisons évidentes de sécurité, on génère un mutant non oncogène délété des séquences codant pour les acides aminés 21 à 26 de la protéine E7 native impliqués dans la fonction de transformation par mutagenèse dirigée du vecteur M13TG8188 à l'aide de l'oligonucléotide oTG5118 (SEQ ID NO. 1). On obtient M13TG9104. Le gène E7 muté est désigné ci-après E7\*.

De même, il a été démontré que la protéine E6 de HPV-16 pouvait interagir avec le produit d'expression du gène suppresseur de tumeur *p53* (Crook et al.,

1991, Cell 67, 547-556). Le domaine impliqué dans cette interaction a clairement été défini et se situe entre les résidus 111 à 115 de la protéine native. Le vecteur M13TG9125 est généré par mutagenèse de M13TG8189 à l'aide de l'oligonucléotide oTG5377 (SEQ ID N°: 2). Le gène E6 muté est désigné ci-après E6\*.

*D. Construction du vecteur de transfert pTG5065 porteur des gènes E6 et E7 de HPV-16 et du gène de l'IL-2 humaine intégrés au locus K1L.*

10 Le fragment *EcoRI* K de 5,2 kb de l'extrémité gauche du génome du virus vaccine Copenhagen (Guillard et al., 1985, J. Virol. 53, 316-318) est cloné dans le plasmide pUC8 (Gibco BRL) linéarisé par *EcoRI*. Le vecteur ainsi obtenu est ensuite soumis à une digestion ménagée par *BglII* suivi d'une ligation afin de déléter un fragment de 855 pb codant pour le gène de restriction d'hôte K1L  
15 (Guillard et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 5573-5577). Le fragment *BglII* de 3,4 kb est isolé de cette construction intermédiaire désignée pUC8Khr puis cloné dans le site *BamHI* du plasmide pUC7 (Gibco BRL). On génère pBAC1 dans lequel on introduit un adaptateur *XhoI* à gauche du site *BglII* unique. Après digestion par *XhoI* et *BglII*, on insère un fragment *SaII-BglII* portant le promoteur vaccine p7,5K. Les deux sites *EcoRI* sont éliminés par digestion *EcoRI* suivi d'un traitement par la Klenow et d'une religation. Le vecteur pTG2147 est obtenu par introduction dans le site unique *BglII* d'un site multiple de clonage isolé du vecteur p poly II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) isolé sous forme d'un fragment  
20 *BglII-BamHI*. Il comprend donc les bras de recombinaison permettant l'insertion au locus K1L encadrant le promoteur p7,5K suivi des sites de restriction.

Les gènes E6\* et E7\* sont clonés en aval du promoteur vaccine pH5R contenu dans le vecteur M13TG9132, pour donner respectivement M13TG9138 et M13TG9139. A titre indicatif, le vecteur M13TG9132 provient de l'insertion du promoteur du gène H5R isolé par PCR du génome viral dans le phage  
30 M13TG6131.

Par ailleurs, l'ADNc codant pour l'interleukine-2 humaine est isolé du

- 19 -

plasmide pTG36 (brevet français 2 583 770), introduit dans un vecteur intermédiaire et ressorti par digestion *SaII-BamHI* pour être inséré dans le vecteur de transfert pTG2147 ciblant le locus K1L. L'insertion se fait au niveau des sites *PstI* et *XbaI* situés en aval du promoteur p7,5K, à l'aide d'adaptateurs de clonage.

5 On obtient pTG5056.

Le bloc d'expression pH5R-E6\* est isolé du vecteur M13TG9139 sous forme d'un fragment *BglII-BamHI* qui est introduit dans le site *BamHI* du vecteur pTG5056. On génère le vecteur pTG5060. Le bloc d'expression pH5R-E7\* est purifié de M13TG9138 et inséré au site *BamHI* du vecteur pTG5060, pour donner  
10 pTG5062. On indique que l'insertion au locus K1L conduit à des virus recombinants ayant une capacité de réplication réduite voire même détruite dans certains types cellulaires. Pour ces raisons, on introduit un marqueur de sélection positive pour faciliter l'identification des virus recombinants. Le vecteur pTG5065 résulte du clonage dans le site *BamHI* de pTG5062 d'une cassette d'expression  
15 "pK1L-gène LacZ" isolée du plasmide pIV75 (Chen et al., 1993, *Virology* 196, 682-693) par clivage *BglII-BamHI*. Comme visualisé à la Figure 2, il permet le transfert des blocs E6\*, E7\* et IL-2 au sein du locus K1L du virus de la vaccine

Le virus de la vaccine recombinant, dénommé VVTG5065, est généré par recombinaison homologue après transfection du vecteur pTG5065 dans les cellules  
20 embryonnaires de poulet infectées par la vaccine Copenhague sauvage et repérées par coloration sous gélose au X-Gal. Les virus de la vaccine VVTG5021 et VVTG5065 sont utilisés dans des essais d'infections doubles. Les doubles recombinants sont sélectionnés selon les deux marqueurs : formation de plages bleues en présence de X-Gal et délétion du marqueur TK. Ceux-ci, dénommés  
25 VVTG5021&5065, expriment les blocs p7,5K-IL-2, pH5R-E6\* et pH5R-E7\* intégrés au locus K1L et les blocs p7,5K-L1 et p7,5K-L2 intégrés au locus TK.

L'expression des gènes de HPV peut être vérifiée par analyse en Western blot à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux appropriés ou par PCR  
30 reverse. La production d'IL-2 peut être évaluée par test ELISA ou test CTL comme décrit dans la littérature. A titre indicatif, le niveau d'expression in vitro est de l'ordre de 60 ng/ml/10<sup>6</sup> cellules infectées à 1 pfu/cellule et 24h.

EXEMPLE 2. Construction d'un virus vaccine Copenhague exprimant les gènes E6, E7, et le gène IL-2 humain

L'ADNc codant pour l'interleukine-2 humaine est isolé du plasmide pTG36  
5 par digestion *Pst*I et inséré dans le site *Pst*I du plasmide pTG186, donnant lieu à pTG188. Le virus obtenu par recombinaison homologue est dénommé VVTG188.

Le gène E6\* est isolé de M13TG9125 sous forme d'un fragment *Pst*I-  
*Bam*HI et inséré en aval du promoteur 7,5K entre les sites *Pst*I et *Xba*I de  
pTG2147 en présence d'un adaptateur *Bam*HI-*Xba*I, donnant lieu à pTG5057. Le  
10 gène E7\* est placé sous le contrôle du promoteur vaccine H5R produisant M13TG9138 et la cassette bordée par les sites *Bam*HI-*Bgl*II est sous-clonée dans le site *Bam*HI de pTG5057. On obtient pTG5059, dans le site *Bam*HI duquel on insère le marqueur de sélection *LacZ* sous la dépendance du promoteur du gène vaccine K1L isolé par digestion *Bgl*II-*Bam*HI du vecteur pIV75. La construction  
15 résultante est désignée pTG5061 et le virus généré par recombinaison homologue avec le génome vaccine VVTG5061.

Un virus de la vaccine recombinant exprimant les gènes E6\* et E7\* intégrés  
au locus K1L et le gène de l'IL-2 humaine intégré au locus TK est obtenu par co-  
infection de cellules embryonnaires de poulet par les virus VVTG5061 et  
20 VVTG188. A titre indicatif, ce dernier produit environ une quantité d'IL-2 supérieure à 400 ng pour 10<sup>6</sup> cellules infectées à 1 pfu par cellule pendant 24h. Le virus doublement recombinant est désigné VVTG5061&188.

EXEMPLE 3: Construction d'un virus vaccine Copenhague exprimant les gènes E6, E7, et le gène codant pour le cofacteur d'adhésion B7.1 humain

L'ADNc codant pour B7.1 est isolé d'une préparation d'ARNm obtenue de  
la lignée cellulaire Daudi (ATCC CCL-213) par PCR reverse en utilisant les  
amorces oTG6353 et oTG6352 (SEQ ID NO: 3 et 4). On indique que la séquence  
30 du gène est divulguée dans Genbank sous le numéro d'accèsion M27533. Le fragment amplifié est cloné entre les sites *Bgl*II et *Eco*RI du M13TG6131

- 21 -

conduisant au M13TG9149 puis entre les sites *Bam*HI et *Eco*RI du pTG186. La construction est dénommée pTG5090 et le virus obtenu par recombinaison homologue VVTG5090. Un virus de la vaccine exprimant les gènes E6\* et E7\* de HPV-16 intégrés au locus K1L et le gène B7.1 humain intégré au locus TK peut  
5 être obtenu par co-infection de cellules embryonnaires de poulet par les virus VVTG5061 et VVTG5090. le virus recombinant est désigné VVTG5061&5090.

EXEMPLE 4: Construction d'un virus vaccine souche MVA exprimant les gènes E6, E7, et le gène B7.1 intégrés au sein de la zone d'excision III

10

Le virus MVA dérive de la souche du virus de la vaccine Ankara. Il n'est pas capable de générer des particules infectieuses sur les cellules de mammifères mais se développe correctement sur des fibroblastes embryonnaires de poulet. Son adaptation à ces cellules a provoqué l'excision de 6 régions non essentielles pour son développement et son cycle infectieux sur ce type de cellules (disparition  
15 d'environ 15 % du génome viral ; Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038). L'intégration de matériel génétique exogène peut être réalisé au niveau de l'une quelconque de ces zones d'excision. Dans le cadre de la présente invention, on utilise les excisions II et III localisées au niveau des fragments de restriction  
20 *Hind*III N et A respectivement (Altenburger et al., 1989, Arch. Virol. 105, 15-27)

Dans un premier temps, on construit le vecteur pTG6019 permettant l'insertion dans la zone d'excision III du virus MVA. Les bras de recombinaison homologue de part et d'autre de la zone d'excision III sont isolés par PCR à partir du génome viral (voir brevet américain US 5,185,146) et des amorces oTG7637  
25 et oTG7638 (SEQ ID N0: 5 et 6) pour le bras gauche et oTG7635 et oTG7636 (SEQ ID N0: 7 et 8) pour le bras droit. Les fragments amplifiés sont clonés au site *Eco*RI du vecteur pTG1E, pour donner pTG6019. Le matériel génétique à transférer est inséré entre les deux bras de recombinaison. Le vecteur pTG1E est similaire au pTG1H (brevet français 2 583 429) mis à part la présence d'un  
30 adaptateur *Eco*RI à la place de sites multiples de clonage.

On insère en premier lieu une cassette d'expression du gène marqueur *gus*

- 22 -

- A. Le promoteur 7,5K est tout d'abord cloné dans le site *Bam*HI de pTG6019. On obtient pTG6021 dans le site *Bam*HI duquel on insère le gène *gus A* généré sous forme d'un fragment *Bgl*II-*Bam*HI. Celui-ci peut être obtenu à partir de la séquence divulguée dans la littérature. La construction résultante est dénommée pTG6022.
- 5 La présence du marqueur va permettre de discriminer les virus sauvages des virus recombinants par détection de l'activité enzymatique GUS par le substrat XglcA. Une coloration rouge révèle l'activité  $\beta$ -glucuronidase. Cependant, dans l'optique d'une application clinique, il peut être utile d'être en mesure d'éliminer ce marqueur bactérien du produit final après la sélection des virus recombinants. Pour ce faire,
- 10 on met à profit la capacité de la vaccine à déléter les séquences comprises entre deux sites homologues. C'est pourquoi on insère un second promoteur p7,5K en aval du gène *gus A* dans une orientation sens par rapport à celui qui dirige l'expression de ce dernier. Le vecteur pTG6022 est modifié par insertion entre les sites *Bam*HI et *Sac*I d'un fragment p7,5K muni d'extrémités cohésives, pour donner
- 15 pTG6025.

- Celui-ci est complété par l'insertion des cassettes d'expression des gènes E6\* et E7\* mutées. On commence par introduire une nouvelle séquence promotrice p7,5K cette fois en orientation antisens par rapport aux précédentes. Cette construction dénommée pTG6039 comprend donc la cassette GUS labile
- 20 "p7,5K→*gus A*-p7,5K→" suivie de p7,5K dans l'orientation opposée. En parallèle, les gènes E6\* et E7\* sont isolés respectivement des vecteurs M13TG9104 et M13TG9125 par digestion *Bam*HI et *Pst*I et assemblés en orientation opposée l'un à l'autre au site *Pst*I de M13TG6131. L'ensemble est resorti sous forme d'un fragment *Pst*I qui est inséré dans pTG6039 linéarisé par cette même enzyme. On
- 25 obtient le vecteur pTG6056 qui contient les séquences suivantes p7,5K→*gus A*-p7,5K→E7\*-E6\*←p7,5K".

- Le gène immunostimulateur B7.1 est intégré dans cette dernière construction. Pour ce faire, le vecteur pTG6056 est clivé par *Hind*III et *Kpn*I avant d'être mis en ligation en présence des oligonucléotides oTG10451 et oTG10450
- 30 (SEQ ID N°: 9 et 10), pour générer pTG6070. Ces derniers vont permettre le clonage de la cassette d'expression "pH5R-B7.1" par recombinaison homologue.



- 23 -

A cet effet, les séquences B7.1 isolées de M13TG9149 sont clonées en aval du promoteur vaccine pH5R, pour former M13TG9184. Le fragment *Bgl*II-*Eco*RI portant la cassette est intégré dans le vecteur pTG6070 linéarisé par *Xho*I par recombinaison homologue dans *E. coli*. On obtient le vecteur pTG6079 qui au total comporte le gène marqueur *gus A* sous une forme "labile" et les cassettes d'expression des gènes précoces de HPV-16 ainsi qu'une cassette du gène de costimulation B7.1. Le virus généré par recombinaison homologue avec le génome MVA est désigné MVATG6079.

Les blocs d'expression des gènes tardifs du HPV-16 peuvent être insérés au sein de la zone d'excision II à l'aide du vecteur de transfert pTG6018. Celui-ci est construit par insertion au site *Eco*RI de pTG1E des bras de recombinaison gauche et droit bordant l'excision II, générés par PCR en utilisant les amorces oTG7665 et oTG7584 (SEQ ID N°: 11 et 12) et oTG7639 et oTG7640 (SEQ ID N°: 13 et 14). Comme précédemment, on intègre entre les deux bras une cassette d'expression d'un marqueur positif pour faciliter la détection des virus recombinants, celui-ci pouvant être éliminé après l'étape de sélection (Spehner et al., 1990, J. Virol. 64, 527-533). Le vecteur pTG6020 résulte du clonage du gène *LacZ* placé en aval du promoteur p7,5K dans le vecteur pTG6018 linéarisé par *Bam*HI. Le pTG6020 est modifié par l'insertion d'une séquence p7,5K entre ses sites *Bam*HI et *Sac*I situés en aval du gène *LacZ*. On obtient pTG6024. Les cassettes L1 et L2 peuvent ensuite être introduites selon une stratégie telle que montrée à la Figure 3.

EXEMPLE 5: Construction d'un virus vaccine souche MVA exprimant les gènes E6, E7, et le gène IL-2 intégrés au sein de la zone d'excision III

On utilise la même stratégie que précédemment pour introduire le gène IL-2 dans le vecteur pTG6056. Après clonage des oligonucléotides de recombinaison oTG10503 et oTG10502 (SEQ ID N°: 15 et 16) pour produire pTG6076, ce dernier est clivé par *Xho*I et le fragment *Bgl*II-*Eco*RI préparé à partir de M13TG9185 (pH5R-IL-2) inséré par recombinaison homologue. Le vecteur

pTG6090 ainsi obtenu comprend le gène marqueur *gus A* sous une forme "labile", les cassettes d'expression des gènes précoces de HPV-16 ainsi qu'une cassette du gène IL-2 humain. Le virus recombinant obtenu par recombinaison homologue avec le génome MVA est désigné MVATG6090. Les gènes tardifs peuvent être  
5 intégrés dans la zone d'excision II en mettant en oeuvre le pTG6018, comme indiqué ci-dessus.

EXEMPLE 6 : Validation du vecteur VVTG5021&5065 en modèle animal

10 *A. Etudes de toxicité*

Des souris nude ont reçu  $10^7$  pfu de VVTG5021&5065 ou  $10^7$  pfu de virus vaccine sauvage par voie intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée ou intracrâniale. Des lots de 5 souris sont constitués selon le type de virus injecté et  
15 la voie d'administration et on évalue 26 jours après l'injection, le nombre d'animaux présentant des lésions liées à la vaccine. Les souris ayant reçu le virus recombinant ne montrent aucune lésion quelles que soient la voie d'administration utilisée alors que la majorité des animaux traités avec la vaccine sauvage présente des lésions avec une fréquence et une gravité fonction de la voie d'administration. De plus, des  
20 décès sont enregistrés dans le cas d'une injection intraveineuse et intracrâniale. Ces données montrent que le VVTG5021&5065 est atténué par rapport au virus sauvage et qu'il n'entraîne pas de lésions même après une injection intracrâniale.

*B. Expériences d'immunoprophylaxie avec le VVTG5021&5065*

25

Des souris C57BL6 ont été vaccinées à trois reprises par voie sous-cutanée avec  $10^7$  pfu de VVTG5021&5065. Trois jours après la dernière immunisation, ces animaux sont éprouvés avec  $10^3$  cellules E7W1 implantées en sous-cutané. A titre  
30 indicatif, les cellules E7W1 proviennent d'une lignée de lymphome murin transfectée par un vecteur exprimant le gène E7 oncogène de HPV-16. Le pourcentage de survie des animaux en fonction du temps est comparé à celui

- 25 -

obtenu avec des souris témoins traitées avec  $10^7$  pfu d'un virus de la vaccine non recombinant VVTG186 (dérivé du vecteur TG186 décrit ci-dessus). Le suivi de la mortalité montre une différence entre les deux groupes. Dans le groupe témoin, 100 % des animaux sont morts à J36 alors que 40 % des animaux vaccinés par VVTG5021&5065 sont encore vivants à J36 et plus de 30 % à J51.

Ainsi les virus recombinants exprimant des antigènes de HPV et un gène immunostimulateur présentent une activité antitumorale à l'encontre des cellules tumorales exprimant l'oncogène E7 de HPV-16.

#### 10 C. *Expériences d'immunothérapie*

Des souris C57 BL6 sont inoculées avec  $10^3$  cellules E7 W1 implantées en sous-cutanée (J0).  $10^7$  pfu de virus recombinants, sont ensuite administrés également en sous-cutanée à J3 puis J6 et enfin J9 et le pourcentage de survie des animaux est déterminé par rapport aux animaux contrôles ayant reçu un virus non recombinant. Alors que 100 % des animaux contrôles sont morts, on observe un accroissement notable de la survie des animaux injectés avec un mélange de VVTG5061&5021 et de VVTG188. Des résultats similaires sont obtenus après administration de VVTG5065&5021 et VVTG188.

20 Ces expériences d'immunothérapie ont été reproduites en utilisant un modèle tumoral différent, des cellules BMK16 myc remplaçant les cellules E7w1. Les cellules BMK16myc sont des cellules de rein de souris nouveau-nées transfectées par le génome de HPV-16 et le gène c myc murin. Les animaux sont traités par  $10^7$  virus MVA TG6090 exprimant les gènes E6\*, E7\* de HPV-16 et l'IL-2 humaine. Par rapport aux contrôles, les souris traitées présentent un retard de la croissance tumorale jusqu'à J15.

- 26 -

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: TRANSGENE SA  
(B) RUE: 11 rue de Molsheim  
(C) VILLE: Strasbourg  
(E) PAYS: France  
(F) CODE POSTAL: 67082  
(G) TELEPHONE: (33) 88 27 91 00  
(H) TELECOPIE: (33) 88 27 91 11

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Composition pharmaceutique contre les  
tumeurs  
et infections a papillomavirus

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 16

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 36 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Human papillomavirus  
(B) SOUCHE: HPV-16  
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5118  
(E7 delete 21 a 26)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

- 27 -

TCTGAGCTGT CATTAAATTG AGTTGTCTCT GGTTCG

36

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Human papillomavirus
- (B) SOUCHE: HPV-16
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5377  
(E6 delete 111 a 115)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TGTCAGATG TCTTTGCAGT GGCTTTTGAC AG

32

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG6353  
(PCR gene B7.1)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TCAGCCCCTG AATTCTGCGG ACACTGTTAT ACAGG

35

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- 28 -

- (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG6352  
(PCR gene B7.1)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TTGACCCTAA AGATCTGAAG CCATGGGCCA CAC

33

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
  - (B) SOUCHE: Ankara modifiée
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7637  
(PCR zone III)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGGGGGGAAT TCAGTAAACT TGAATAATC TT

32

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

- 29 -

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Vaccinia virus

(B) SOUCHE: Ankara modifiée

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7638  
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGGGGGGGAT CCGAGCTCAC CAGCCACCGA AAGAGCAAT

39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 32 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Vaccinia virus

(B) SOUCHE: Ankara modifiée

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7635  
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGGGGGGGAT CCGGAAAGTT TTATAGGTAG TT

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- 30 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Vaccinia virus

(B) SOUCHE: Ankara modifiée

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthèse OTG7636  
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGGGGGGAAT TCTTTGTATT TACGTGAACG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 78 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthèse OTG10451

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CTTATACAGG GCGTACACTT TCCCTTCTCA ATCTCTCTCG AGTTGTATTT ATTTTCATTT

60

TTTAAGTATA GAATAAAA

78

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 86 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI



- 31 -

## (vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10450

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AGCTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAAATACAA CTCGAGAGAG ATTGAGAAGG 60

GAAAGTGTAC GCCCTGTATA AGGTAC 86

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7665  
(PCR zone II)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

ATGGTACCGA ATTCCATCTA CCAATTCATC CAACAACAT 39

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 41 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (iii) ANTI-SENS: OUI

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7584

- 32 -

(PCR zone II)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GGCTGCAGGA TCCGAGCTCA TCATGACGTC CTCTGCAATG G

41

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7639  
(PCR zone II)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GGGGGGGGAT CCTGTGAATC ATCCATTCCA CT

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucl otide de synthese oTG7640  
(PCR zone II)

- 33 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GGGGGGGAAT TCGTTACTAA ATTGCAAGGA AAT

33

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 69 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10503

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CTCAAGTCAG TGTGAGATG ATGCTTTGAC AACTCGAGTT TATTTTCATT TTTTAAGTAT

60

AGAATAAAA

69

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 77 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10502

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

AGCTTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAAACTCGA GTTGTCAAAG CATCATCTCA

60

ACACTGACTT GAGGTAC

77

Revendications

1. Composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus qui comprend à titre d'agents thérapeutiques  
5  
(1) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus et au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus,  
(2) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus, au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice, ou  
10  
(3) au moins un polypeptide originaire d'une région précoce ou tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice.  
15
2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que le polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus dérive de la protéine E6, de la protéine E7 ou des protéines E6 et E7 d'un papillomavirus.  
20
3. Composition pharmaceutique selon la revendication 2, caractérisée en ce que le polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus est un variant non oncogène de la protéine E6 et/ou E7 d'un papillomavirus.
- 25 4. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus dérive de la protéine L1, de la protéine L2 ou des protéines L1 et L2.
- 30 5. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le polypeptide ayant une activité immunostimulatrice est sélectionné parmi le groupe constitué par l'interleukine-2, l'interleukine-7, l'interleukine-12

- 35 -

et les molécules de co-adhésion B7.1 et B7.2.

6. Composition pharmaceutique selon la revendication 5, caractérisée en ce que le polypeptide ayant une activité immunostimulatrice dérive de l'interleukine-2.

5

7. Composition pharmaceutique selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que le polypeptide ayant une activité immunostimulatrice dérive de la molécule B7.1.

- 10 8. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (1) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1 et un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus,
- 15 (2) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,
- (3) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de la molécule B7.1,
- 20 (4) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus, un polypeptide dérivé de la molécule B7.1 et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,
- (5) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,
- 25 (6) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de la molécule B7.1, ou
- 30

- 36 -

(7) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus, un polypeptide dérivé de la molécule B7.1 et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2.

5

9. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le papillomavirus est sélectionné parmi les types HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 et/ou HPV-45.

10

10. Composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus qui comprend à titre d'agent(s) thérapeutique(s) un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dans le(s)quel(s) sont insérés des fragments d'ADN codant pour :

15

(1) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus et au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus,

(2) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus, au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice, ou

20

(3) au moins un polypeptide originaire d'une région précoce ou tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice ;

25

lesdits fragments d'ADN étant placés sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte.

11. Composition pharmaceutique selon la revendication 10, caractérisée en ce que lesdits polypeptides ont les caractéristiques définies aux revendications 2 à 9.

30

12. Composition pharmaceutique selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en

- 37 -

ce que le vecteur recombinant est un vecteur viral dérivant du génome d'un virus sélectionné parmi les poxvirus, les adénovirus, les rétrovirus, les virus de l'herpès et les virus associés à l'adénovirus.

- 5 13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce que le vecteur recombinant dérive d'un poxvirus sélectionné parmi le groupe constitué par le virus de la vaccine, le canaripox et le fowlpox.
- 10 14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13, caractérisée en ce que le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine sélectionné parmi les souches Copenhagen, Wyeth et Ankara modifiée (MVA).
- 15 15. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 ou 14, caractérisée en ce que les éléments essentiels à l'expression des fragments d'ADN codant pour lesdits polypeptides comprennent un promoteur d'un gène d'un virus de la vaccine sélectionné parmi les promoteurs des gènes thymidine kinase (TK), 7,5K, H5R et K1L.
- 20 16. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche Copenhagen et que les fragments d'ADN codant pour lesdits polypeptides sont insérés dans le locus TK et/ou le locus K1L dudit virus de la vaccine.
- 25 17. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche MVA et que les fragments d'ADN codant pour lesdits polypeptides sont insérés au niveau de l'une quelconque des zones d'excision sélectionnées parmi les excisions I, II, III, IV, V et VI dudit virus de la vaccine.
- 30 18. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 17, destinée au traitement ou la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus

- 38 -

caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dérivé(s) d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans le(s)quel(s) sont insérés .

- 5           (1)       un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- (2)       un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2,
- 10       (3)       un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1 et un fragment  
d'ADN codant pour l'interleukine-2,
- (4)       un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
15       un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un  
papillomavirus,
- (5)       un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
20       un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- (6)       un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
25       un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2, ou
- (7)       un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
30       un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,



- 39 -

un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1 et un fragment  
d'ADN codant pour l'interleukine-2.

- 5 19. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 17, destinée à la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dérivé(s) d'un virus de la vaccine de la souche Copenhagen ou MVA dans le(s)quel(s) sont insérés .
- 10 (1) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- (2) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2, ou
- 15 (3) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2 et un fragment  
d'ADN codant pour la molécule B7.1.
- 20 20. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 19, caractérisée en ce que le vecteur recombinant est vivant ou tué.
21. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisée en ce qu'elle comporte un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique
- 25 permettant son administration par injection à l'homme ou à l'animal.
22. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 21, à titre de médicament pour le traitement ou la prévention du cancer du col de l'utérus, d'une dysplasie du col de bas grade et d'une infection à papillomavirus.

30

1/3

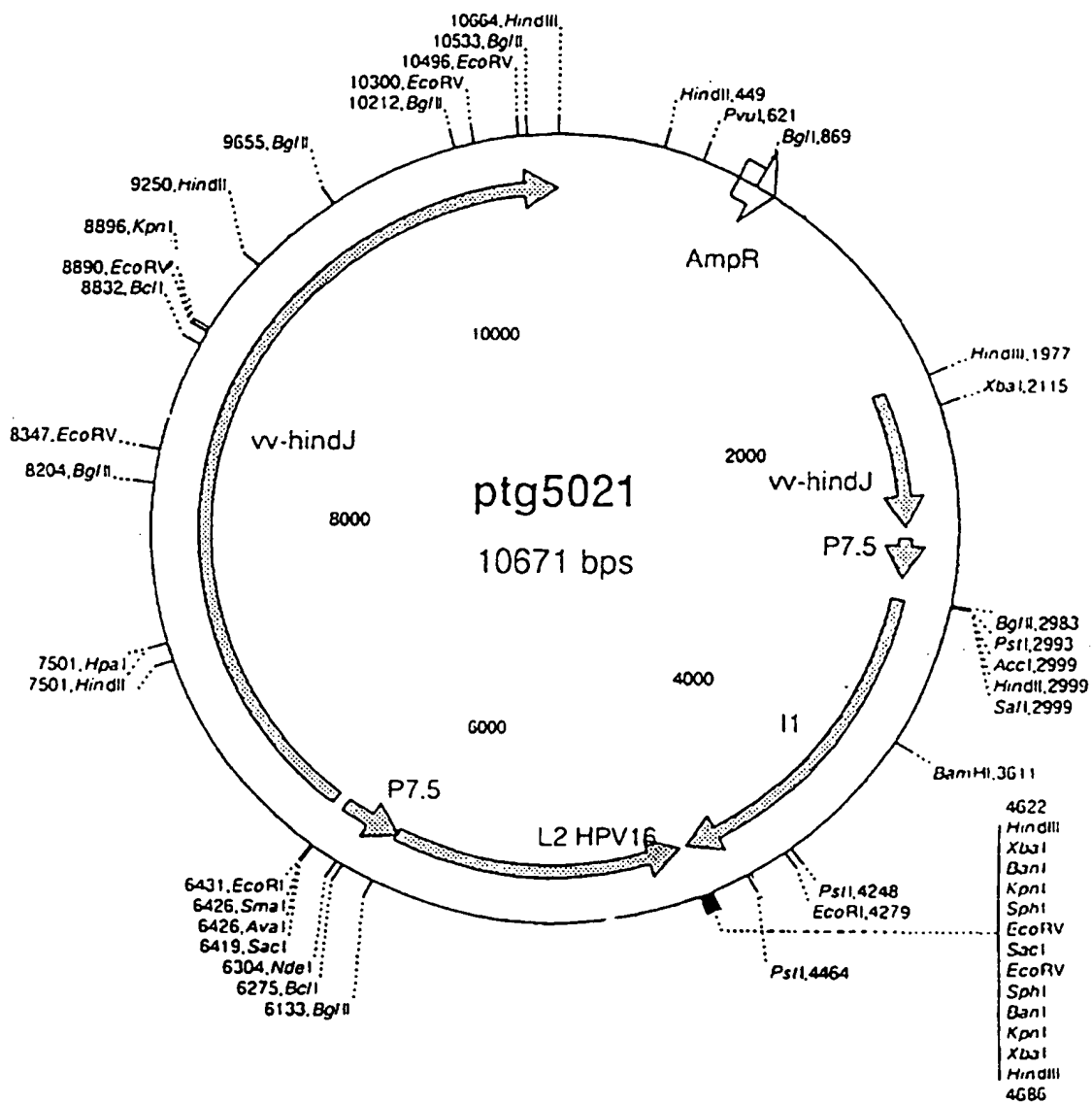


FIG. 1

2 / 3

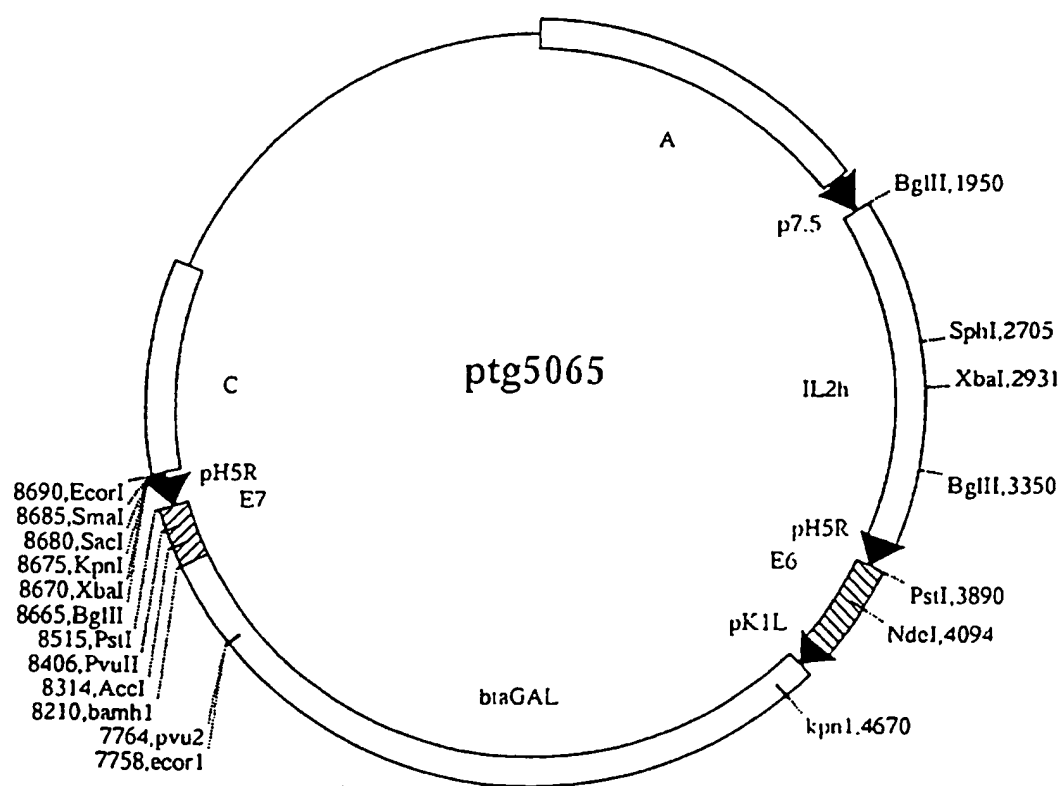


FIG. 2

3/3

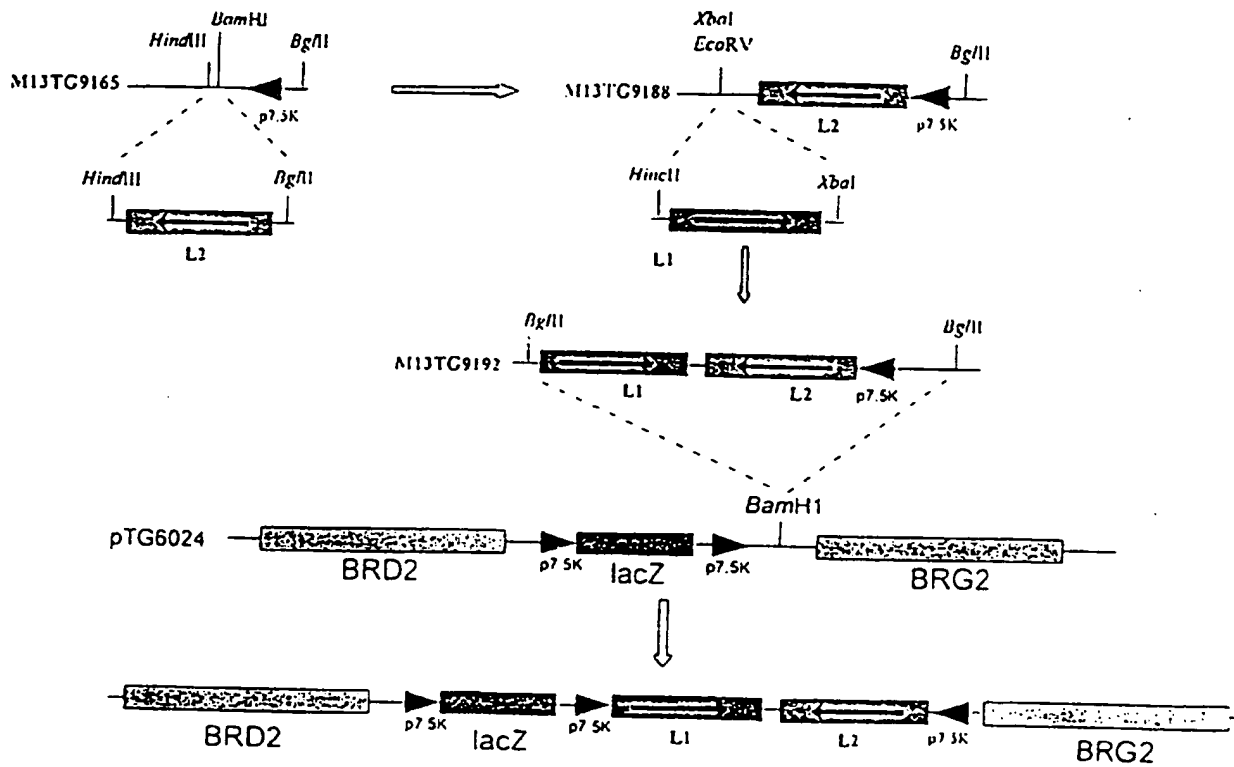


FIG. 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01412

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/37 A61K39/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 00436 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH) 7 January 1993  see page 3, paragraph 2 - page 5, paragraph 3 see page 14, paragraph 3 - page 15, paragraph 3 see claims 1,10; figure 4  ---	1-4, 9-11, 20-22
X	WO 94 23037 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;CAMPO MARIA SEVERIA (GB); JARRETT WILLIA) 13 October 1994 see page 5, line 1 - page 8, line 19 see page 20, line 11 - page 22, line 13  ---  -/--	1-4, 9-11, 20-22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 1997

Date of mailing of the international search report

26/11/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/01412

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 11274 A (US HEALTH) 18 April 1996  see page 4, line 4 - page 5, line 21 -----	1-4, 9-11, 20-22
A	WO 93 02184 A (UNIV QUEENSLAND ;CLS LIMITED (AU)) 4 February 1993 cited in the application see page 5, line 32 - page 8, line 28 -----	
A	WO 90 10459 A (TRANSGENE SA) 20 September 1990 cited in the application see page 3, line 1 - page 5, line 36 see page 8 - page 14; example 1 -----	
A	WO 96 00583 A (MERCK & CO INC ;DONNELLY JOHN J (US); LIU MARGARET A (US); MARTINE) 11 January 1996 see page 7, line 9 - page 8, line 18 -----	
P,X	WO 96 29091 A (UNIV CAMBRIDGE TECH ;STANLEY MARGARET ANNE (GB); SCARPINI CINZIA G) 26 September 1996 see the whole document -----	1-5, 9-12, 20-22

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01412

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9300436 A	07-01-93	AU 662910 B	21-09-95
		AU 1985992 A	25-01-93
		EP 0592480 A	20-04-94
		JP 6508988 T	13-10-94
WO 9423037 A	13-10-94	AU 6381794 A	24-10-94
		CA 2158554 A	13-10-94
		EP 0692028 A	17-01-96
		JP 8508728 T	17-09-96
WO 9611274 A	18-04-96	US 5618536 A	08-04-97
		AU 3828495 A	02-05-96
		EP 0789766 A	20-08-97
WO 9302184 A	04-02-93	AU 651727 B	28-07-94
		EP 0595935 A	11-05-94
		JP 7505042 T	08-06-95
WO 9010459 A	20-09-90	FR 2643817 A	07-09-90
		DE 69002325 T	02-12-93
		EP 0462187 A	27-12-91
		ES 2058898 T	01-11-94
		JP 5503282 T	03-06-93
WO 9600583 A	11-01-96	AU 2694595 A	25-01-96
		EP 0768893 A	23-04-97
		FI 965224 A	27-12-96
		HU 76446 A	29-09-97
		NO 965590 A	28-02-97
		PL 317874 A	28-04-97
		SK 164196 A	06-08-97
		ZA 9504641 A	26-01-96
WO 9629091 A	26-09-96	AU 5151596 A	08-10-96

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Donn. Internationale No

PC1/FR 97/01412

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12N15/37 A61K39/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 93 00436 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH) 7 janvier 1993  voir page 3, alinéa 2 - page 5, alinéa 3 voir page 14, alinéa 3 - page 15, alinéa 3 voir revendications 1,10; figure 4 ---	1-4, 9-11, 20-22
X	WO 94 23037 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ; CAMPO MARIA SEVERIA (GB); JARRETT WILLIA) 13 octobre 1994 voir page 5, ligne 1 - page 8, ligne 19 voir page 20, ligne 11 - page 22, ligne 13 ---	1-4, 9-11, 20-22
X	WO 96 11274 A (US HEALTH) 18 avril 1996  voir page 4, ligne 4 - page 5, ligne 21 ---	1-4, 9-11, 20-22
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 novembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/11/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der : Internationale No  
PCT/FR 97/01412

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 93 02184 A (UNIV QUEENSLAND ;CLS LIMITED (AU)) 4 février 1993 cité dans la demande voir page 5, ligne 32 - page 8, ligne 28 ---	
A	WO 90 10459 A (TRANSGENE SA) 20 septembre 1990 cité dans la demande voir page 3, ligne 1 - page 5, ligne 36 voir page 8 - page 14; exemple 1 ---	
A	WO 96 00583 A (MERCK & CO INC ;DONNELLY JOHN J (US); LIU MARGARET A (US); MARTINE) 11 janvier 1996 voir page 7, ligne 9 - page 8, ligne 18 ---	
P,X	WO 96 29091 A (UNIV CAMBRIDGE TECH ;STANLEY MARGARET ANNE (GB); SCARPINI CINZIA G) 26 septembre 1996 voir le document en entier -----	1-5, 9-12, 20-22

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à . . . membres de familles de brevets

Der . . . e Internationale No

PCT/FR 97/01412

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9300436 A	07-01-93	AU 662910 B	21-09-95
		AU 1985992 A	25-01-93
		EP 0592480 A	20-04-94
		JP 6508988 T	13-10-94
WO 9423037 A	13-10-94	AU 6381794 A	24-10-94
		CA 2158554 A	13-10-94
		EP 0692028 A	17-01-96
		JP 8508728 T	17-09-96
WO 9611274 A	18-04-96	US 5618536 A	08-04-97
		AU 3828495 A	02-05-96
		EP 0789766 A	20-08-97
WO 9302184 A	04-02-93	AU 651727 B	28-07-94
		EP 0595935 A	11-05-94
		JP 7505042 T	08-06-95
WO 9010459 A	20-09-90	FR 2643817 A	07-09-90
		DE 69002325 T	02-12-93
		EP 0462187 A	27-12-91
		ES 2058898 T	01-11-94
		JP 5503282 T	03-06-93
WO 9600583 A	11-01-96	AU 2694595 A	25-01-96
		EP 0768893 A	23-04-97
		FI 965224 A	27-12-96
		HU 76446 A	29-09-97
		NO 965590 A	28-02-97
		PL 317874 A	28-04-97
		SK 164196 A	06-08-97
		ZA 9504641 A	26-01-96
WO 9629091 A	26-09-96	AU 5151596 A	08-10-96